

NOTA TÉCNICA

DETECCIÓN DE *Xanthomonas albilineans* AGENTE CAUSAL DE LA ESCALDADURA FOLIAR DE LA CAÑA DE AZÚCAR USANDO LA TÉCNICA DE ELISA Y MEDIOS SELECTIVOS

Odaliz Jiménez¹ y Nancy Contreras²

RESUMEN

La escaldadura de la hoja de la caña de azúcar, causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, puede presentar diferentes tipos de síntomas debido a su carácter sistémico. Dado que en la fase de latencia las plantas infectadas pueden carecer de síntomas externos, lo cual dificulta su diagnóstico y favorece la diseminación de la enfermedad, el objetivo de este trabajo fue tratar de detectar a *X. albilineans* en muestras sintomáticas y asintomáticas mediante la técnica de ELISA indirecta y la utilización de los medios selectivos XAS y modificado de Wilbrinks. Se logró detectar a *X. albilineans* mediante la técnica de ELISA indirecta en 98,22 % de muestras sintomáticas, y utilizando los medios selectivos, se encontró una frecuencia de detección de 97,33 y 61,78 % para el XAS y modificado de Wilbrinks, respectivamente. En muestras asintomáticas se logró la detección en 18,75 % mediante la técnica de ELISA, y 15,18 y 8,93 % utilizando los dos medios selectivos, respectivamente. La técnica de ELISA indirecta y el medio XAS pudieran ser utilizados como métodos de diagnóstico para la detección de *X. albilineans* en muestras sintomáticas y asintomáticas de caña de azúcar.

Palabras clave adicionales: Bacterias, método de diagnóstico, *Saccharum officinarum*

ABSTRACT

Detection *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald, using Elisa technique and selective media

Leaf scald sugarcane, caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, can present different types of symptoms due to its systemic character. Because in the phase of latency the infected plants may lack external symptoms, which makes difficult the diagnosis of the disease and favors its dissemination, the objective of this research was to detect *X. albilineans* in symptomatic and asymptomatic samples by means of the technique of indirect ELISA and two selective means (XAS y modified of Wilbrinks). The technique of indirect ELISA allowed 98.22 % of detection, while the use of XAS and modified means of Wilbrinks allowed a frequency of detection of 97.33 and 61.78 %, respectively. In asymptomatic samples the detection was 18.75 % by means of the ELISA technique, and 15.18 and 8.93 %, respectively, for XAS and modified of Wilbrinks. Technique of indirect ELISA and selective means XAS could be used as a diagnostic method of for *X. albilineans* detection in symptomatic and asymptomatic samples of sugarcane.

Additional key words: Bacteria, diagnostic method, *Saccharum officinarum*

INTRODUCCIÓN

La escaldadura de la hoja de la caña de azúcar, causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson constituye una de las principales enfermedades por su efecto sobre los rendimientos, la calidad de los jugos y las

elevadas pérdidas que provoca en su fase aguda, estimadas entre 90 y 100 % (Swings y Civerolo, 1993).

En Venezuela, en el año 1968, fueron detectados síntomas de la escaldadura y a partir de 1973 se determinó que se trataba de *X. albilineans* (Ordosgoitti et al., 1977). Posteriormente, en el

Recibido: Enero 2, 2008

Aceptado: Mayo 30, 2008

¹ Dpto. de Fitotecnia, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". e-mail: odalizjimenez@ucla.edu.ve

² Posgrado de Fitopatología, Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado. Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: ncontreras@ucla.edu.ve

año 2004 se observaron síntomas de la enfermedad en campos experimentales y comerciales de los estados Lara y Yaracuy comprobándose que eran causados por la bacteria (Jiménez et al., 2004).

La escaldadura puede presentar diferentes tipos de síntomas debido a su carácter sistémico. En la fase de latencia las plantas infectadas pueden carecer de síntomas externos durante largos períodos, lo que dificulta el diagnóstico y favorece la diseminación de la enfermedad (Rott et al., 1997). Las principales alternativas para el control de la escaldadura de la hoja son el uso de variedades resistentes y material de siembra certificado, para lo cual la disponibilidad de métodos eficaces de diagnóstico resulta indispensable (Iglesia et al., 2003). Los procedimientos de aislamiento e identificación han sido facilitados utilizando medios selectivos (Kado y Heskett, 1970). Entre éstos se encuentran el MW (medio modificado de Wilbriks) y el XAS (Davis et al., 1994).

En las últimas décadas se ha incrementado la aplicación de métodos inmunológicos. Dentro de ellos se ha extendido el uso del Elisa por ser más rápido y preciso (Peralta et al., 2001). Se ha sugerido que una combinación del aislamiento en medio de cultivo y el uso de técnicas serológicas pudieran ser necesarias para la detección eficiente de *X. albilineans* (Comstock e Irej, 1992).

Por la importancia que representa esta enfermedad en Venezuela y la necesidad de desarrollar métodos más efectivos de diagnóstico, en este trabajo se planteó como objetivo detectar a *X. albilineans* en muestras sintomáticas y asintomáticas mediante la técnica de Elisa indirecta, así como comparar la efectividad de esta técnica con la utilización de medios selectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de las muestras

Se colectaron muestras de hojas y tallos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) que presentaban síntomas de la enfermedad, así como muestras asintomáticas, en seis campos comerciales (Centro Agrario Montaña Verde, finca La Pica, finca Los Sivira, Azucarera Río Turbio, Agropecuaria La Yaguara y Azucarera Pío Tamayo) y dos experimentales (INIA-Yaritagua e INIA-San Felipe) de los estados Lara y Yaracuy.

Las cañas tenían entre 7 y 9 meses de edad y fueron tomadas al azar. Cada muestra estuvo compuesta de 20 esquejes y 20 hojas por cada 5 ha de caña. El recorrido de los lotes se hizo en forma de zig-zag y perimetral. En total fueron realizados 8 muestreos para un total de 225 muestras sintomáticas y 112 muestras asintomáticas en 25 variedades (PR980, SP715574, PR6132, SP715574, C32368, B75403, SP724928, CR74250, JA6419, SP701284, CP721210, RB74454, PR692176, CP742005, CC8592, C26670, RB855536, RB855113, RB855546, RB855035, PR692178, CP721210, CP722086, RAGNAR y B63118). Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas previamente identificadas y fueron llevadas al laboratorio.

Posteriormente, se seleccionaron muestras foliares y esquejes que fueron lavadas suavemente con agua corriente. Se realizaron pequeños cortes de tejido foliar del área circundante a la lesión (0,56 cm²) sobre una base de madera previamente esterilizada con alcohol al 70 % y sometida a fuego. Los trocitos se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 minutos y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril durante 1 minuto. Luego, fueron colocados sobre papel absorbente previamente esterilizado con la finalidad de eliminar el exceso de humedad. Finalmente 20 trocitos de área foliar fueron colocados en tubos de centrifuga tipo Eppendorf, agregándole a cada tubo 1,5 mL de solución buffer fosfato (PBS) y se guardaron a temperatura de -20 °C. Este procedimiento se realizó tanto para hojas sintomáticas como para asintomáticas (French y Hebert, 1980; Hampton et al., 1993).

Para la extracción del jugo se tomaron esquejes previamente lavados que fueron flameados, cortados en trocitos y colocados en un molino adaptado para la extracción. El jugo extraído fue filtrado utilizando gasa estéril y almacenado a -20 °C.

Muestras foliares y esquejes de caña de la variedad CC8592 con síntomas fueron utilizados como controles positivos; igualmente, se utilizó cultivo bacteriano de *X. albilineans*. Como controles negativos se usaron muestras foliares y esquejes de caña sanos.

Técnica Elisa indirecta

Se obtuvo antisuero a partir del antígeno

somático seleccionando un cultivo bacteriano de *X. albilineans* aislado de esquejes de caña de azúcar y se aplicó la metodología señalada por Klement et al. (1990). Posteriormente se realizó la inmunización, para lo cual se utilizaron dos conejas blancas raza Nueva Zelanda de 2 meses de edad (Contreras y Trujillo, 1984; Hernández y Trujillo, 1993).

A los 7, 14, y 21 días después de haber aplicado la última inyección se colectó alrededor de 30 mL de sangre para obtener los antisueros homólogos (Fisac, 1991). El título del antisuero se realizó mediante la prueba de aglutinación en tubo. La purificación de inmunoglobulinas (IgG) se realizó a partir de soluciones de sulfato de amonio (Peralta et al., 2001).

Para la aplicación de la técnica, se utilizó la metodología de Peralta et al. (2001) y se usaron placas de Elisa rígidas de 96 celdas. Previo a la aplicación de la técnica se obtuvieron las diluciones óptimas mediante calibración y se procedió a la sensibilización agregando 100 µL por pozo de las muestras según diseños establecidos.

En cada placa se colocaron controles positivos y negativos así como también los blancos. Luego se siguieron los procedimientos de bloqueo, reacción antígeno-anticuerpo, reacción enzima conjugada-anticonejo, reacción enzima-sustrato hasta el desarrollo de color amarillo, y lecturas a 405 nm de absorbancia en un equipo Elisa LabSystems Multiskan-Ex versión 1.0 (tipo 355). Finalmente se detuvo la reacción con 50 µL por pozo de NaOH 3M. Se realizaron lecturas en cada placa a los 20 y 45 minutos. Las muestras con valores de absorbancia por encima de tres veces el valor de absorbancia de los controles negativos fueron consideradas como reacciones positivas (Rowhani et al., 1994).

Utilización de medios selectivos MW y XAS

Se sembró en forma estriada cultivo bacteriano de *X. albilineans* de 72 h de crecimiento sobre placas de Petri que contenían los medios MW (5 g bactopectona, 10 g sucrosa, 0,5 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g Na_2SO_3 , 15 g de bactoagar y 1 L de agua destilada) y XAS (5 g bactopectona, 10 g sucrosa, 0,5 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g Na_2SO_3 , 15 g de bactoagar, 5 g de KBr, 100 mg de cycloheximide, 2 mg de benomyl,

25 mg de cefalexina, 30 mg de novobiocin, 50 mg de kasugamicina y 1 L de agua destilada), selectivos para *X. albilineans* (Davis et al., 1994). Luego de la siembra, las placas se incubaron a temperatura de 28 °C durante 48-72 h. Adicionalmente se sembró en estos medios el macerado extraído de los trocitos de hoja y del jugo de caña de azúcar de cada una de las muestras procesadas e igualmente fueron incubadas hasta el desarrollo o no de las colonias bacterianas, lo cual indicaba la presencia o ausencia del patógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró detectar a *X. albilineans* mediante la técnica de ELISA indirecta en 221 muestras sintomáticas de un total de 225 para un 98,22 % de detección. Utilizando los medios selectivos XAS y MW se encontraron frecuencias de detección de 97,33 % y 61,78 %, respectivamente (Cuadro 1). Igualmente, se logró detectar la bacteria en un 18,75 % de las muestras asintomáticas mediante la técnica de Elisa, siendo menor la detección al utilizar los medios XAS y MW (15,18 y 8,93 %, respectivamente). Se encontró que sobre el MW generalmente se desarrolló gran cantidad de saprófitos asociados con el cultivo, lo que usualmente interfirió con la detección de *X. albilineans*. El XAS permitió una mejor detección y presentó una alta selectividad a este patógeno.

Cuadro 1. Detección de *X. albilineans* en tallos de caña de azúcar sintomáticos (n = 225 tallos) y asintomáticos (n = 112 tallos) mediante la técnica de Elisa indirecta y los medios selectivos XAS y MW

Método	Sintomático		Asintomático	
	Nº	%	Nº	%
Elisa (+)	221	98,22	21	18,75
Medio XAS (+)	219	97,33	17	15,18
Medio MW (+)	139	61,78	10	8,93

Se encontró que el MW falló en detectar a *X. albilineans* en 86 muestras sintomáticas; pero al utilizar la técnica de Elisa y el XAS se logró detectar a la bacteria en las mismas muestras (Cuadro 2). Así mismo, de los 21 tallos asintomáticos que resultaron positivos a *X. albilineans*, 9 fueron detectados por los tres

métodos y 17 por la técnica de Elisa y el XAS. En forma similar, Comstock e Irey (1992) lograron detectar altos porcentajes de *X. albilineans* en tallos sintomáticos de caña de azúcar.

Cuadro 2. Comparación de la técnica de Elisa indirecta y los medios selectivos XAS y MW para la detección de *X. albilineans* en tallos de caña de azúcar

Método			Sintomático		Asintomático	
Elisa	XAS	MW	Nº	%	Nº	%
+	+	+	132	58,67	9	8,04
+	+	-	84	37,33	8	7,14
+	-	+	4	1,78	1	0,89
+	-	-	1	0,44	3	2,68
-	+	+	2	0,89	0	0,00
-	-	+	1	0,44	0	0,00
-	+	-	1	0,44	0	0,00
-	-	-	0	0,00	91	81,25
Total de muestras			225		112	

En tallos sintomáticos, el promedio de la población de *X. albilineans* ha sido $2,8 \times 10^{10}$ células·mL⁻¹ mientras que las poblaciones en tallos asintomáticos han sido detectados a bajos niveles ($1,1 \times 10^5$ células·mL⁻¹) (Davis et al., 1994). La presencia de altas poblaciones de *X. albilineans* en tallos sintomáticos probablemente se deba a las detecciones positivas por técnicas serológicas en el rango de 90,4 a 100 % (Comstock e Irey, 1992).

En tallos asintomáticos el rango de detección usando serología estuvo entre 6,3 y 18,5 % (Comstock e Irey, 1992; Davis et al., 1994). De igual manera, Comstock et al. (1997) detectaron a *X. albilineans* en el 99 % de tallos asintomáticos examinados utilizando la técnica de Elisa. En tallos asintomáticos la bacteria fue detectada serológicamente en sólo 1,4 % de los casos. En aislamientos sobre el MW se detectó al patógeno en todos los tallos que dieron positivos serológicamente, así como en el 16 % de los asintomáticos negativos serológicamente.

El resultado obtenido utilizando los medios selectivos MW, XAS y la técnica de Elisa coincide con los encontrados por otros autores en otros sistemas patógeno-hospedante utilizando diferentes medios selectivos y algunas variantes de Elisa. Álvarez y Lou (1985) desarrollaron una prueba de Elisa de “doble sándwich” (DAS) para detectar a *X. campestris* pv. *campestris* en plantas de repollo, lo cual les permitió procesar un gran

número de muestras sintomáticas y detectar al patógeno en todas ellas.

Por su parte, Díaz et al. (2001) lograron caracterizar más de 150 aislamientos de *X. albilineans* de diferentes variedades de caña de azúcar de distintas localidades sobre el MW; todos los aislamientos presentaron similares patrones culturales y bioquímicos. No obstante, encontraron diferencias sexológicas entre diferentes aislamientos utilizando pruebas de Elisa indirecta.

CONCLUSIONES

Los mejores métodos para la detección de *X. albilineans* resultaron ser la técnica de Elisa y el uso del medio selectivo XAS.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” por el financiamiento del Proyecto 016-TAG-2002.

LITERATURA CITADA

1. Álvarez, A. y K. Lou. 1985. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by Elisa. Plant Disease 69(12): 1082-1086.
2. Comstock, J. y M. Irey. 1992. Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, Elisa, and isolation techniques. Plant Disease 76: 1033-1035.
3. Comstock, J., Z. Wang y R. Perdomo. 1997. The incidence of leaf scald and its effect on yield components. Sugarcane 4: 18-22.
4. Contreras, N. y G. Trujillo. 1984. Evaluación de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en lotes de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante técnica combinada del medio semi-selectivo e inmunodifusión en agar. Agronomía Tropical 34(4-6): 54-68.
5. Davis, M., P. Rott, P. Baudin y J. Dean. 1994. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas*

- albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. Plant Disease 78: 78-82.
6. Díaz, M., E. Peralta y A. Iglesia. 2001. *Xanthomonas albilineans* Haplotype B responsible for a recent sugarcane leaf scald disease outbreak in Cuba. Plant Disease 85: 334.
 7. Fisac, R. 1991. Serología. En: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos. Ministerio de agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. pp. 313-364.
 8. French, E. y T. Hebert. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Editorial IICA. San José, Costa Rica. 289 p.
 9. Hampton, R. S. De Boer, y O. Ball. 1993. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory Manual. American Phytopathology Society. S. H. eds St Paul; Minnesota, U.S.A. 389 p.
 10. Hernández, Y. y G. Trujillo. 1993. Obtención y aplicación de antisueros a dos patovares de *Xanthomonas campestris*. Rev. Fac. Agron. (UCV) 19: 37-50.
 11. Iglesia, A., M. Díaz., E. Álvarez., E. Peralta y V. Pazos. 2003. Optimización del diagnóstico múltiple de la escaldadura foliar y el raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. Rev. Protec. Veg. 18(1): 15-18.
 12. Jiménez, O., N. Contreras y H. Nass. 2004. *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en los estados Lara y Yaracuy. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 21(3): 233-245.
 13. Kado C. y M. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60(6): 969-976.
 14. Klement, Z., K. Rudolph y D. Sands. 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó. Budapest.
 15. Ordosgoitti, A., A. Manzano y A. Aponte. 1977. La escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. Agronomía Tropical 27(2): 235-252.
 16. Peralta, E., Pedroso, M. y Martínez, Y. 2001. Diagnóstico de Fitopatógenos. Manual Teórico-Práctico. CENSA. La Habana, Cuba. 134 p.
 17. Rott, P., I. Mohamed, P. Klett, D. Soupa, A. Saint-Albin, P. Feldmann y P. Letourmy. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. Phytopathology 87: 1202-1213.
 18. Rowhani, A., A. Feliciano, T. Lipst y W. Gubler. 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. Plant Disease 78(3): 248-250.
 19. Swings, J. y Civerolo, E. 1993. *Xanthomonas*. Ed. Chapman and Hall. London.